

На правах рукописи

УДК 577.151

РУДАКОВА НАТАЛЬЯ ЛЕОНИДОВНА

**НОВАЯ СЕКРЕТИРУЕМАЯ МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗА
BACILLUS INTERMEDIUS**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Балабан Нэлли Павловна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории биохимии РЦПБ СПИД
Коксин Владимир Петрович

Доктор ветеринарных наук, профессор
Федерального центра токсикологии и радиационной
безопасности
Фаизов Тагир Хадиевич

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики РАН г. Казань

Защита диссертации состоится «25» ноября 2010 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан « 23 » октября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

Актуальность проблемы: Протеолитические ферменты представлены в геномах всех живых организмов: от прокариот и вирусов до высших эукариот. Они важны для жизни и здоровья человека, о чем свидетельствует тот факт, что в геноме человека обнаружены более 640 генов, кодирующих пептидазы или их гомологи [Sterchi et al., 2008]. Интересно, что по результатам секвенса генома человека не отмечено существенного возрастания количества генов, кодирующих сериновые протеиназы, но заметно увеличено количество генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы семейства метцинкинов по сравнению с геномами низших эукариот [Хофманн, 2001]. В свою очередь, уровень экспрессии этих ферментов в бактериальных геномах составляет менее 1% от общей протеолитической активности клеток [Шарипова с соавт., 2000, 2002].

Метцинкины – один из кланов цинкзависимых эндопептидаз, отличающийся от других представителей металлопротеиназ наличием продленного мотива активного центра фермента HEXXHXXGXXH и консервативной структурой Met-поворота в молекуле белка. Метцинкины обнаружены у многих организмов от прокариот до млекопитающих. Выяснение роли и функций этих белков в биологических процессах способствовало развитию исследований их структуры, физико-химических свойств и функциональных особенностей. Выделение и изучение бактериальных метцинкинов стало возможным с развитием постгеномных технологий и методов генной инженерии, позволяющих клонирование генов на основе знания геномных последовательностей бактерий и создания эффективных векторов экспрессии. До сих пор одной из главных научных задач остается выяснение роли этих белков в физиологии про- и эукариот. Установлено, что метцинкины в эукариотических клетках принимают участие как в различных деструктивных процессах, так и высоко специфичном и ограниченном протеолизе, осуществляя регуляторные функции на посттрансляционном уровне. Повреждение регуляторных механизмов может привести к возникновению и развитию патологических процессов [Gomis-Rüth, 2003]. Эукариотические и бактериальные метцинкины ответственны за возникновение таких патологий как воспалительные процессы, тканевая деструкция, неврологические болезни, кардиозаболевания, обширное метастазирование при онкологических заболеваниях [Gomis-Rüth, 2003, 2009]. Важная роль, которую метцинкины играют в жизни и здоровье человека, ведет к необходимости исследования структурных и функциональных особенностей этих ферментов и механизма их действия *in vitro* и *in vivo*.

Ранее показано, что бактерии *Bacillus intermedius* 3-19 секретируют в среду протеиназы, среди которых доминируют сериновые: субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза [Шарипова с соавт., 2000]. Гены ферментов клонированы и секвенированы, последовательности зарегистрированы в Международной базе данных (AN AY 754946 и AN Y15136). Изучена экспрессия обоих генов в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* [Sharipova et al., 2007, 2008]. Соответствующие белки выделены в гомогенном состоянии и подробно охарактеризованы [Михайлова с соавт., 2007, Шамсутдинов с соавт., 2008]. Наряду с сериновыми протеиназами бактерии *B. intermedius* выделяют в среду металлоэндопептидазу, последовательность гена которой установлена и занесена в Международную базу данных (AN 75740.2)

Целью работы явилась разработка эффективного способа очистки и получения гомогенного препарата металлоэндопептидазы *B. intermedius* 3-19, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, определение первичной структуры фермента, его классификация и исследование физико-химических свойств.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Оптимизация среды культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* для максимальной продукции металлоэндопептидазы MprBi.
2. Разработка условий выделения и очистки гомогенного препарата металлоэндопептидазы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма.
3. Определение и анализ первичной структуры эндопептидазы MprBi и установление классификационной принадлежности фермента.
4. Определение субстратной специфичности металлоэндопептидазы.
5. Исследование энзиматических свойств рекомбинантного белка.

Научная новизна: впервые выделена и очищена до гомогенного состояния секретируемая щелочная цинкзависимая металлопротеиназа MprBi. Разработан простой и эффективный способ выделения и очистки фермента из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Определена аминокислотная последовательность фермента, его субстратная специфичность, кинетические характеристики и энзиматические свойства. Получены приоритетные данные о том, что новая эндопептидаза бацилл является гомологом эукариотических адамализиноподобных эндопептидаз клана метцинкинов. Фермент является первым и единственным представителем семейства адамализиноподобных эндопептидаз у бацилл.

Практическая значимость результатов.

Оптимизированы условия биосинтеза металлопротеиназы MprBi рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Разработан эффективный способ очистки фермента, позволяющий получить 4-5 мг гомогенного белка из 1 л культуральной жидкости. Новая бациллярная металлопротеиназа является гомологом эукариотических адамализиноподобных эндопептидаз клана метцинкинов, многие представители которого являются ферментами, ответственными за возникновение и развитие заболеваний.

Положения, выносимые на защиту:

1. Среда культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* для получения максимальной продукции металлоэндопептидазы MprBi имеет повышенное содержание пептона и неорганического фосфата в качестве основных компонентов и включает казеин и казаминовые кислоты в качестве дополнительных источников питания.
2. Получение гомогенного препарата металлоэндопептидазы MprBi осуществляется с помощью хроматографии на гидрофобном носителе бутил-сефарозе с минимальным количеством стадий очистки.
3. На основании сравнительного анализа первичной структуры металлопротеиназы *B. intermedius* с другими цинкзависимыми металлопротеиназами MprBi классифицирована как гомолог семейства

эукариотических адамализиноподобных металлоэндопептидаз клана метцинкинов.

4. Металлопротеиназа MprVi является термостабильным щелочным ферментом, чувствительным к ионам двухвалентных металлов и обладающим широкой субстратной специфичностью.

Апробация работы: Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и региональных конференциях: IV научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2004), Всероссийской научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004), XLII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» секция биология (Новосибирск, 2004) (Диплом III степени), V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес.» (Казань, 2005), VI симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2007), Международной конференции аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2007, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009) (грамота за лучший доклад), Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 16 научных работ.

Место выполнения работы и благодарности. Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан за внимательное отношение к работе и обсуждение полученных результатов; профессору М.Р. Шариповой и к.б.н., доц. А.М. Мардановой за постоянные консультации и обсуждение результатов; д.х.н., профессору Г.Н. Руденской за предоставление специфических хромогенных субстратов, сорбента бацитрацин-силохрома и возможность проведения части экспериментов в лаборатории Химии природных соединений химического факультета МГУ (Москва), профессору С.В. Кострову (ИМГ РАН) за предоставление плазмиды pCM4, профессору Günter Lochnit (Гиссен, Германия) за помощь в определении N-концевой последовательности методом Эдмана и MALDI-TOF спектрометрии; профессору Eugenio Ferrari (Genencor Int. Inc., США) за предоставление протеазо-дефицитного штамма *B. subtilis* BG2036. Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского университета проф. О.Н. Ильинской и сотрудникам кафедры микробиологии за помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста, включает 14 таблиц, 22 рисунка. Библиография содержит 117 наименований российских и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды. Объектом исследования являлся рекомбинантный эритромициноустойчивый штамм *Bacillus subtilis*. Он получен путем трансформации плазмиды pSA1 в протеазо-дефицитный штамм *B. subtilis* BG2036, из хромосомы которого делетированы гены внеклеточных протеиназ (штамм любезно предоставлен проф. Eugenio Ferrarri, Genencor Int. Inc., USA). Мультикопийная плаزمида pSA1, сконструированная на основе экспрессионного вектора pCB22 [Sorokin et al., 1990], несет полный ген металлопротеиназы *B. intermedius* mprBi под собственным промотором. Ген субклонирован с 6 кб фрагмента геномной ДНК *B. intermedius* (pCM4) (pCM4 получена в ИМГ РАН и предоставлена для работы проф. С.В. Костровым). Нуклеотидная последовательность гена mprBi занесена в Международную банк генов «GeneBank» с кодом доступа EU678894. Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили по методу [Anagnostopoulous et al., 1961].

Условия культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Для культивирования клеток рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG2036 (pSA1) были использованы среды следующего состава (г/л): бактериологический пептон (Sigma, США) – 17, дрожжевой экстракт (Sigma, США) – 10, NaCl – 3, CaCl₂ – 0,1, MgSO₄ – 0,1, MnSO₄ – 0,1, NH₄Cl – 0,1, pH 7,7 (пептон-содержащая среда) [Шакиров с соавт., 2000]; L-бульон (среда LB, Лурия-Бертани) (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5; pH 7,7 [Sambrook et al., 1989].

Перед посевом в среды добавляли стерильный раствор Na₂HPO₄ и антибиотик вносили 1 мкг/мл. Среда стерилизовали при 1 атм.

Культивирование проводили на вибростенде (B.Braun, Германия) при 37°C в течение 30 ч (200 об/мин). Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием.

Количество биомассы определяли на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при 590 нм и выражали в единицах оптической плотности.

Образование спор *Bacillus subtilis* определяли с помощью подсчета клеток и спор на окрашенных по Пешкову препаратах в режиме микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Jena, Германия) при увеличении 1600 раз в 4 полях зрения. Количество свободных спор выражали в процентах от общего числа вегетативных и спорулирующих клеток. Для оптимизации питательной среды варьировали содержание пептона от 10 до 30 г/л и неорганического фосфата от 0,8 до 1,6 г/л. Казеин и казаминовые кислоты вносили в среду стерильно перед посевом в концентрациях от 0,1 до 2 г/л. Соли двухвалентных металлов в конечных концентрациях: Zn²⁺ 0,5 – 3,0 мМ, Mg²⁺ 3,0 – 9,0 мМ, Ca²⁺ 4,0 – 18,0 мМ, Mn²⁺ 2,0 – 6,0 мМ и Fe²⁺ 0,5 – 2,0 мМ вносили в питательную среду перед посевом в виде стерильных растворов.

Определение локализации фермента. Локализацию металлопротеиназы определяли измерением уровня протеолитической активности по гидролизу азоказеина в клеточных фракциях. Клетки после 24, 30 и 36 часов культивирования отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (5 мин при 10 тыс. об/мин) и отмывали 0,85% раствором NaCl. Клеточную суспензию инкубировали с лизоцимом (1 мг/мл) (Sigma, США) в 10 мМ трис-HCl буфере (Sigma, США) pH 8,5 в присутствии 20% сахарозы (Реахим, Россия) в течение 25 мин при комнатной

температуре. Образование протопластов контролировали микроскопированием. Протопласты отделяли центрифугированием при 10 тыс.об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант содержал белки клеточной стенки. Солюбилизацию мембраносвязанных ферментов проводили обработкой протопластов раствором детергента 0,1% Тритон X-100 (FERAK BERLIN, Германия) в 0,1 М трис-НСl буфере рН 8,0 с 50 мМ NaCl, а также 1М NaCl с добавлением 20 % сахарозы. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь центрифугировали (13 тыс. об/мин, 20 мин). Супернатант содержал белки мембраны. Для получения фракции внутриклеточных белков протопласты разрушали осмотическим шоком при добавлении 5 мМ трис-НСl буфера рН 7,8 при 4°C. К смеси добавляли ДНКазу (1 мг/мл) (Koch-Light Limited, Великобритания), инкубировали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали 30 мин при 15 тыс. об/мин. Супернатант содержал фракцию внутриклеточных белков. Чтобы исключить влияние сериновых протеиназ, активность металлопротеиназы во всех фракциях определяли в присутствии 5 мМ PMSF (Serva, Германия). При определении протеолитической активности металлопротеиназы в клеточных фракциях активность выражали в ед/мг биомассы.

Определение белка. Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ оптической единице (опт. ед.) в кювете толщиной 1 см, а также по методу Брэдфорд [Bradford, 1976].

Определение протеолитической активности по гидролизу азоказеина. Протеолитическую активность металлопротеазы определяли по гидролизу азоказеина (Sigma, США) [Charney et al., 1947, Demidyuk et al., 2004] и по гидролизу казеина (Serva, Германия) [Каверзнева, 1971]. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры определяли как отношение величины протеолитической активности к оптической плотности культуральной жидкости и выражали в % или в усл. ед. При очистке фермента удельную активность определяли как отношение протеолитической активности к единице белка и выражали в ед/мг белка.

Выделение и очистка протеиназы рекомбинантного штамма. Сульфатаммонийную фракцию 0,2-0,7 насыщения диализовали против 0,05М трис-НСl буфера рН 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} и проводили очистку на колонке с бацитрацин-силохромом, уравновешенным тем же буфером. Элюцию проводили тем же буфером, содержащим 1М NaCl и 7% изопропанола.

Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Ферментный раствор после бацитрацин-силохрома диализовали против 0,01М трис-НСl буфера рН 8,0 с 5 мМ Ca^{2+} и проводили хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (Sigma, США), уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили аналогичным буфером, содержащим 0,6 М NaCl.

Очистка фермента на гидрофобном носителе бутил-сефарозе. На колонку с бутил-сефарозой HiTrap (Pharmacia, США), уравновешенной 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} , содержащим 35% сульфата аммония, помещали фермент, отдиализованный против того же буфера. Элюцию проводили тем же

буфером с понижением концентрации сульфата аммония до 20-15%. Полученные фракции диализовали против 0,05М трис-НСl буфера рН 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} .

Электрофорез в ПААГ. Степень чистоты полученных препаратов и молекулярную массу определяли методом электрофореза в 12,5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лаэммли [Laemmli, 1970]. Гель окрашивали Кумасси ярко-голубым (Serva, Германия), а также раствором 0,3 М ZnCl_2 с предварительной обработкой 0,2 М имидазола.

Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprBi. Использовали ингибитор PMSF, ЭДТА, 1,10-фенантролин, рСМВ, HgCl_2 и белковый ингибитор трипсина. Остаточную активность выражали в процентах относительно контроля, активность которого принимали за 100 % в отсутствие ингибиторов в реакционной смеси.

Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF)

Раствор фермента обрабатывали трипсином по методике, изложенной на сайте (<http://www.bioc.uzh.ch>). Полученные пептиды различной молекулярной массы идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF (ThermoBioanalysis, Великобритания). Спектры пептидов обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint (<http://www.matrixscience.com>) и Peptide Mass (<http://cn.expasy.org>).

Определение N-концевой последовательности белка. N-концевую аминокислотную последовательность белка определяли методом Эдмана на приборе Model 816 Protein Sequences (Гиссен, Германия) с использованием анализатора 120A PTH (Applied Biosystems, США).

Определение субстратной специфичности. Субстратную специфичность металлопротеиназы определяли по гидролизу синтетических субстратов Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg- NH_2 , Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg, Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg, Dnp-Gly-Gly-Lys, Dnp-Gly-Gly-Leu-Arg, Dnp-Ala-Ala-Val-Arg по методу Люблинской [Люблинская с соавт., 1987], а также по гидролизу природных субстратов: В-цепи окисленного инсулина, казеина по Гаммерстену и яичного альбумина (Sigma, США). Анализ полученных после гидролиза В-цепи пептидов проводили с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF (<http://expasy.net/tools>). Специфичность металлопротеиназы по гидролизу казеина по Гаммерстену (Sigma, США) и яичного альбумина (Sigma, США) определяли по методу Каверзневой как описано выше.

Каталитические и энзиматические свойства металлопротеиназы MprBi.

Кинетические константы. K_m определяли по гидролизу азоказеина. Расчеты проводили по графику в координатах Лайнуивера–Берка в программной среде «Excel». Каталитическую константу $k_{\text{кат}}$ рассчитывали по формуле $k_{\text{кат}} = V_{\text{max}}/[E]$, где $[E]$ – концентрация фермента. Изоэлектрическую точку фермента определяли с использованием ресурса <http://www.expasy.net/tools/>.

рН-оптимум и рН-стабильность. рН-Оптимум активности фермента определяли по гидролизу азоказеина в 0,05 М трис-НСl буфере с 5 мМ Ca^{2+} в интервале значений рН от 7,2 до 9,5. Для определения рН-стабильности фермент предварительно инкубировали в 0,05 М трис-НСl буфере при значениях рН от 7,2 до 9,5 в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего определяли активность по стандартной методике.

Температурный оптимум и термостабильность. Температурный оптимум фермента определяли по гидролизу азоказеина в 0,05 М Трис-НСl буфере рН 8,0 с 5

мМ Ca^{2+} , инкубируя реакционную смесь при температурах 22, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70° С. При изучении термостабильности растворы фермента предварительно инкубировали 40 мин при температурах от 22° до 70° С и затем определяли активность металлопротеиназы по гидролизу азоказеина по стандартной методике.

Влияние ионов металлов на активность металлопротеиназы. Использовали хлориды кальция, магния, кобальта, меди и никеля в конечной концентрации от 1 до 20 мМ, хлорид цинка – в конечной концентрации от 0,01 до 20 мМ. К ферментному раствору добавляли растворы двухвалентных металлов и выдерживали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем определяли активность фермента по гидролизу азоказеина и выражали в процентах относительно контроля. Контролем (100 %) служил уровень активности фермента в отсутствие ионов металлов.

Математическая обработка результатов. Результаты двухфакторных экспериментов по оптимизации питательной среды обрабатывали с помощью программы STATGRAPHICS. Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среды для культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Для культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* было выбрано две среды: среда LB и пептон-содержащая среда. Среда LB, в состав которой входит триптон и дрожжевой экстракт, была выбрана как оптимальная для культивирования рекомбинантных штаммов, а пептон-содержащая среда являлась исходной для культивирования клеток рекомбинантного штамма *B. subtilis* в экспериментах по оптимизации среды для увеличения продукции сериновых протеиназ [Балабан с соавт., 2004]. Сравнение эффективности двух сред проводили на 30-й ч роста по показателям роста культуры продуцента (OD_{590}), активности металлопротеиназы, а также продуктивности культуры.

Установлено, что рост и продуктивность культуры, а также активность металлопротеиназы на пептон-содержащей среде превышали таковые на среде LB. В связи с этим для дальнейшей работы использовали пептон-содержащая среда.

Динамика роста и накопления металлопротеиназы MprVi в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG2036 (pSA1)

После трансформации плазмиды pSA1 с геном металлопротеиназы *mprVi* в протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG2036 изучали экспрессию гена в рекомбинантном штамме. Отсутствие у штамма-реципиента собственных внеклеточных протеиназ позволяет получить модельный штамм для изучения экспрессии индивидуального гена металлопротеиназы и корректно провести процесс выделения и очистки соответствующего ему индивидуального белка. Полученный модельный рекомбинантный штамм позволил нам во всех экспериментах проводить определение протеолитической активности металлопротеиназы по гидролизу неспецифического субстрата азоказеина.

При исследовании динамики роста и накопления протеолитической активности металлопротеазы MprVi установлено, что активность фермента появляется в культуральной жидкости на 17-й час роста, её уровень достигает максимума на 29-31 ч роста, что соответствует стационарной фазе роста культуры. Протеолитическая активность контрольного беспротеазного штамма *B. subtilis* BG 2036 обнаруживалась в следовых количествах по сравнению с уровнем активности рекомбинантного штамма (рис. 1).

Исследование динамики спорообразования рекомбинантного штамма *B. subtilis* показало, что появление свободных спор в среде наблюдается спустя 6 часов после максимума протеолитической активности фермента. Эти данные свидетельствуют, что металлопротеиназа MprVi является секретируемым ферментом, а не накапливается в результате массового лизиса клеток.

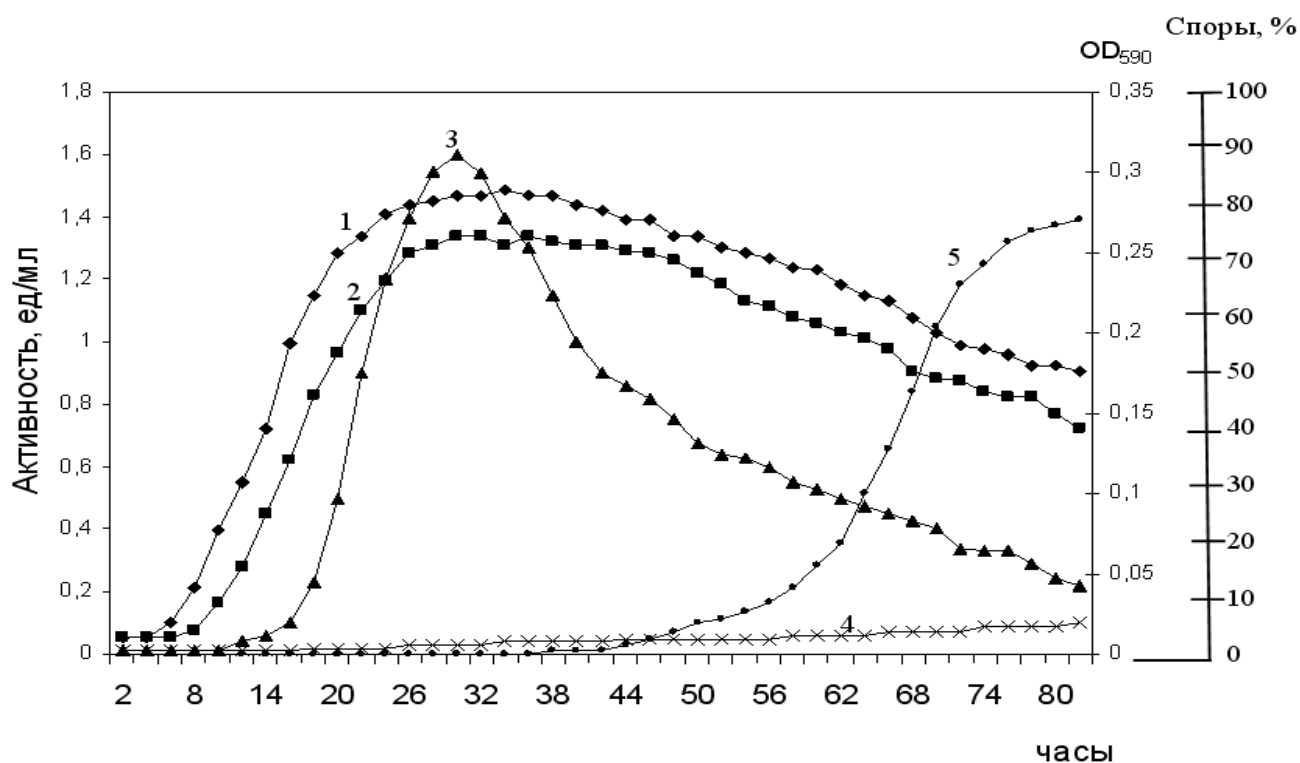


Рис. 1. Динамика роста и накопления протеолитической активности

- 1 — рост беспротеазного штамма
- 2 — рост рекомбинантного штамма
- 3 — протеолитическая активность рекомбинантного штамма
- 4 — протеолитическая активность беспротеазного штамма
- 5 — количество свободных спор

Локализация металлопротеиназы MprVi в клетках рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Сравнение динамики накопления протеолитической активности рекомбинантным и бесплазмидным штаммами указывает на то, что встроенный на плазмиде pSA1 ген *mprVi* кодирует секретируемый белок.

Для определения локализации металлопротеиназы MprVi был исследован уровень протеолитической активности в различных клеточных фракциях рекомбинантного штамма *B. subtilis* (табл.1).

Таблица 1

Активность металлопротеиназы в культуральной жидкости и клеточных фракциях бесплазмидного и рекомбинантного штаммов *B. subtilis*

Фракция	Активность, ед/мг биомассы $\times 10^3$					
	на 24 час роста		на 30 час роста		на 36 час роста	
	рекомбинантн. штамм	бесплазмидн. штамм	рекомбинантн. штамм	бесплазмидн. штамм	рекомбинантн. штамм	бесплазмидн. штамм
Культуральная жидкость	715	32	1324	39	910	45
Клеточная стенка	4,6	3,1	5,0	3,4	6,0	5,5
Мембрана	7,8	8,2	8,7	8,1	9,2	9,0
Цитоплазма	3,4	3,7	5,0	4,8	6,9	7,0

При сравнительном исследовании протеолитической активности в клеточных фракциях максимальную активность обнаружили во фракции культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. В клеточных фракциях этого штамма, а также в клеточных фракциях и культуральной жидкости бесплазмидного штамма уровень протеолитической активности не превышал 3% от уровня активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма. Полученные данные подтверждают, что протеиназа MprVi является секретируемым ферментом.

Подбор компонентов питательной среды для максимальной продукции металлоэндопептидазы MprVi рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Для получения максимального выхода фермента проводили двухфакторный эксперимент. С его помощью исследовали влияние соотношения двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата на биосинтез металлоэндопептидазы MprVi. Концентрации указанных факторов варьировали на трех уровнях: пептон – 10, 20 и 30 г/л, неорганический фосфат – 0,8, 1,2 и 1,6 г/л (рис. 2А, Б).

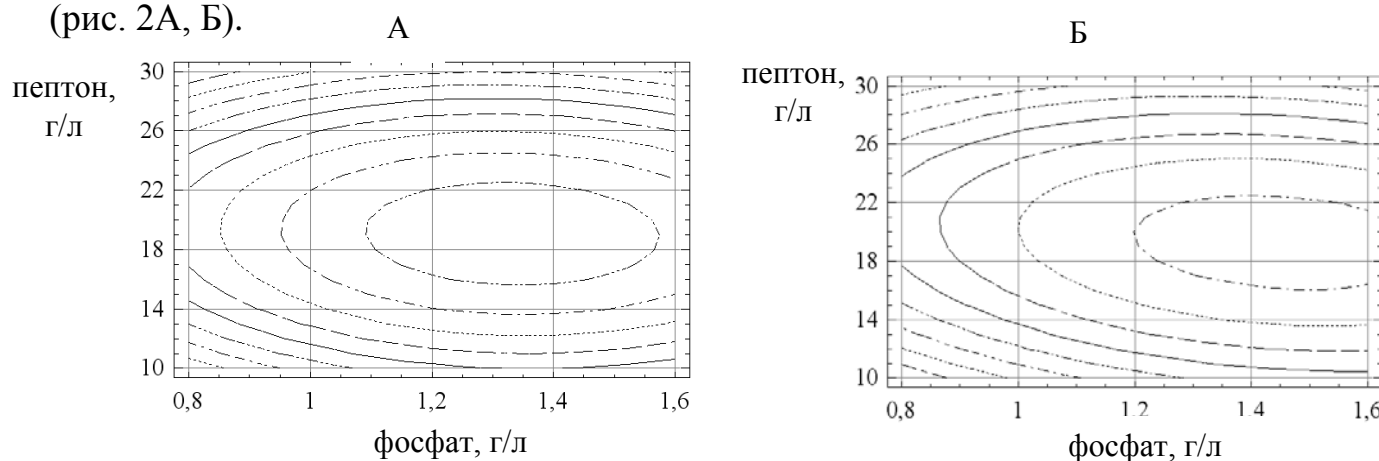


Рис. 2. Влияние концентрации пептона и неорганического фосфата на активность (А) металлопротеиназы MprVi и продуктивность культуры (Б)

Установлено, что максимальная активность металлопротеиназы наблюдается при концентрации в среде пептона 19 г/л и неорганического фосфата 1,3 г/л и максимальная продуктивность культуры - при концентрации пептона 20 г/л и неорганического фосфата 1,45 г/л.

Таким образом, в дальнейшей работе при проведении процедуры очистки белка из культуральной жидкости использовали пептон-содержащую среду с установленными концентрациями пептона и неорганического фосфата 20 г/л и 1,4 г/л соответственно. Известно, что присутствие в питательной среде сложных органических субстратов оказывает стимулирующий эффект на биосинтез фермента. Мы вносили в среду культивирования, содержащую пептон в концентрации 20 г/л и неорганический фосфат 1,4 г/л, белковые субстраты - желатин, альбумин и казеин в концентрациях от 0,1 до 2 г/л. Присутствие в питательной среде желатина и альбумина не увеличивало активность фермента и продуктивность рекомбинантного штамма *B. subtilis* в отношении синтеза металлопротеиназы. Внесение в среду казеина в концентрации 1 г/л увеличивало активность фермента в 3,9 раз и продуктивность культуры в 5 раз, что также подтверждено данными двухфакторного эксперимента, поэтому мы ввели казеин в среду культивирования. Добавление в среду культивирования рекомбинантного штамма казаминовых кислот в концентрации 0,1 г/л увеличивало активность фермента вдвое, продуктивность возрастала в 4,5 раза. Положительный эффект объясняется тем, что казаминовые кислоты являются более доступным дополнительным источником азота и фосфора и для продукции металлопротеиназы MprBi.

Благодаря оптимизации питательной среды удалось повысить уровень активности фермента и продуктивности культуры в 4 раза по сравнению с исходной средой (табл.2).

Таблица 2

Производство металлоэндопептидазы MprBi на исходной и оптимизированной средах

Среда культивирования	OD ₅₉₀	Активность, ед/мл	Продуктивность, усл.ед.
Исходная	0,28	0,31	1,1
Оптимизированная	0,31	1,37	4,4

В результате проведенных исследований нами подобрана оптимальная питательная среда, позволяющая получить максимальную продукцию металлопротеиназы MprBi рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Состав среды (г/л): пептон – 20, неорганический фосфат – 1,4, казеин – 1, казаминовые кислоты – 0,1.

Разработка способа очистки металлопротеиназы MprBi, электрофорез и молекулярная масса белка

Для изучения свойств металлопротеиназы MprBi получали гомогенный белок. Основным методом выделения и очистки металлопротеаз из культуральной жидкости является использование аффинного сорбента. Другим распространенным способом является осаждение фермента из культуральной жидкости с помощью сульфата аммония. Преимуществом этого способа является возможность получения концентрированной фракции белка из большого объема культуральной жидкости, поэтому он широко применяется для многих гидролитических ферментов, в том числе и для металлопротеаз: при очистке нейтральной протеазы *B. amyloliquefaciens*

NPR 68 [Cho et al., 2003], металлопротеазы *B. cereus* TCEC 945 [Feder et al., 1971], *B. subtilis* [Хазиев с соавт., 2002; 2003.] и др.

Первым этапом выделения фермента было проведение дробного фракционирования сульфатом аммония. Были исследованы 4 интервала насыщения культуральной жидкости сульфатом аммония: 0,2 – 0,8; 0,2 – 0,7; 0,3 – 0,7 и 0,3 – 0,8. В результате было установлено, что оптимальным является интервал насыщения 0,2 – 0,7, при котором достигался максимальный выход белка – около 54%, при этом степень очистки составляла 20. В дальнейшей работе мы использовали фракцию фермента, полученную при насыщении сульфатом аммония в интервале 0,2 – 0,7.

В качестве следующего этапа была использована хроматография на гидрофобном носителе бацитрацин-силохроме. В отношении металлопротеиназы MprVi сорбент не проявил аффинных свойств, степень очистки повысилась в 50 раз по сравнению с культуральной жидкостью, выход составил 19,2%.

SDS-электрофорез фракции, полученной после хроматографии на бацитрацин-силохроме показал наличие 4-х белковых полос (рис. 4, дорожка 3).

Для получения гомогенного фермента использовали три способа.

1-й способ – ионообменная хроматография белка на ДЭАЭ-целлюлозе. Полученный после бацитрацин-силохроме и диализа высокоочищенный раствор фермента подвергали хроматографической очистке на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Это позволило увеличить степень очистки в 4 раза по сравнению со степенью очистки фермента на бацитрацин-силохроме и в 180 раз по сравнению с культуральной жидкостью, однако гомогенный белок не был получен.

SDS-электрофорез показал наличие 3-х белковых полос (рис.4, дорожка 4).

2-ой способ – хроматография MprVi на бутил-сефарозе после очистки на бацитрацин-силохроме. Используемый для хроматографии гидрофобный носитель бутил-сефароза показал высокое сродство к ферменту и позволил получить гомогенный препарат металлопротеиназы со степенью очистки 254 по сравнению с культуральной жидкостью, удельная активность составила 12,7 ед/мг, выход белка по активности – 8,7% (табл.3).

SDS-электрофорез показал наличие одной белковой полосы (рис.4, дорожка 5).

Таблица 3

Хроматография на бутил-сефарозе MprVi, полученного после очистки на бацитрацин-силохроме

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ общ., мг	Активность общ., ед. акт.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %	
						по активн.	по белку
Культуральная жидкость	760	11400	595	0,05	1	100	100
Диализат сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1,03	20,6	54	2,74
Хроматография на бацитрацин-силохроме	149	47,5	114,3	2,41	48,2	19,2	0,42
Хроматография на бутил-сефарозе	82,5	4,1	52,0	12,7	254	8,7	0,036

3-й способ – хроматография на бутил-сефарозе диализата сульфатаммонийной фракции фермента.

Поскольку в результате предыдущего способа очистки на бутил-сефарозе был получен гомогенный препарат белка, задачей третьего способа стало уменьшение количества стадий с целью сокращения потерь чистого фермента в процессе очистки. Хроматографии на бутил-сефарозе был подвергнут диализат сульфатаммонийной фракции, в результате удалось получить за 2 стадии очистки хроматографически гомогенный препарат металлопротеиназы MprVi (рис.4, дорожка 6). Степень очистки составила 300, выход – 12%. Выход по активности был на 3 % выше, чем при очистке вторым способом (табл.4, рис.3).

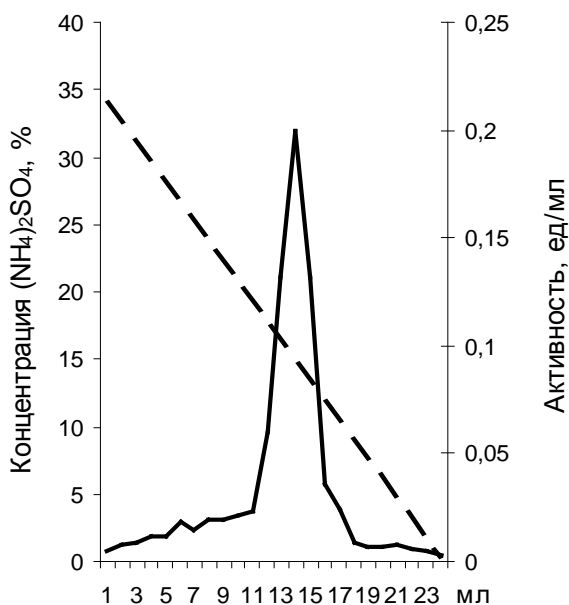


Рис.3. Хроматографическая очистка металлопротеиназы MprVi на бутил-сефарозе

Таблица 4

Хроматография на бутил-сефарозе диализата сульфатаммонийной фракции белка

Стадия очистки	V, мл	Белок общ., мг	Активность общ., ед. акт.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %	
						по активн.	по белку
Культуральная жидкость	760	11400	595	0,05	1	100	100
Диализат сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1,03	20,6	54	2,74
Хроматография на бутил- сефарозе	70	4,8	72,1	15,0	300	12,1	0,042

В результате хроматографии на гидрофобном носителе бутил-сефарозе диализата сульфатаммонийной фракции белка удалось получить за 2 стадии очистки хроматографически гомогенный препарат металлопротеиназы MprVi (рис.4, дорожка 6). Степень очистки составила 300, выход – 12%. Выход по активности был на 3 % выше, чем при очистке вторым способом (табл.4, рис.3).

Молекулярная масса металлопротеиназы, определенная электрофоретически, составляет 19 кДа (рис. 4).

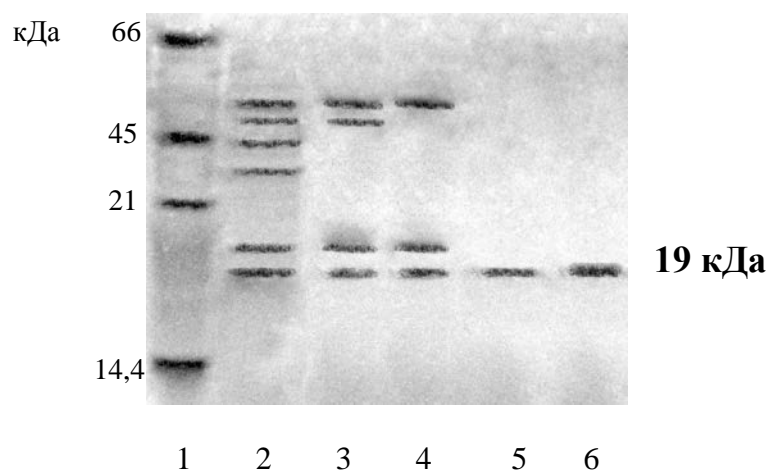


Рис. 4. SDS-электрофорез в ПААГ

- 1 – маркеры: BSA (66 кДа), альбумин (45 кДа), папаин (21 кДа), лизоцим (14,4 кДа)
- 2 – фракция белка после осаждения сульфатом аммония
- 3 – фракция белка после очистки на бацитрацин-силохроме
- 4 - фракция белка после ионообменной хроматографии (1 способ)
- 5 - фракция белка после очистки на бутил-сефарозе (2 способ)
- 6 - фракция белка после очистки на бутил-сефарозе (3 способ)

Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprVi

Изучение влияния различных ингибиторов на активность гомогенной металлопротеиназы показало, что фермент не ингибируется PMSF и белковым ингибитором трипсина, но практически полностью ингибируется 1,10-фенантролином, а также высокими концентрациями ЭДТА, что подтверждает принадлежность фермента к классу металлопротеиназ (табл. 5). Высокие концентрации рСМВ почти полностью ингибируют активность фермента, что позволило предположить наличие остатка цистеина в молекуле белка.

Таблица 5

Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprVi

Ингибитор	Остаточная активность, %	
	Концентрация ингибитора	
	0,5 мМ	5 мМ
PMSF	93,9	91,2
ЭДТА	96	5,7
1,10-фенантролин	5,8	0
рСМВ	94,2	1,9
HgCl ₂	51,1	39,7
Белковый ингибитор трипсина	97	100

Масс-спектрометрический анализ структуры металлопротеиназы MprBi. Определение N-концевой последовательности

Аминокислотная последовательность гомогенного препарата металлопротеиназы MprBi была определена с помощью метода MALDI-TOF - масс-спектрометрии (рис. 5).

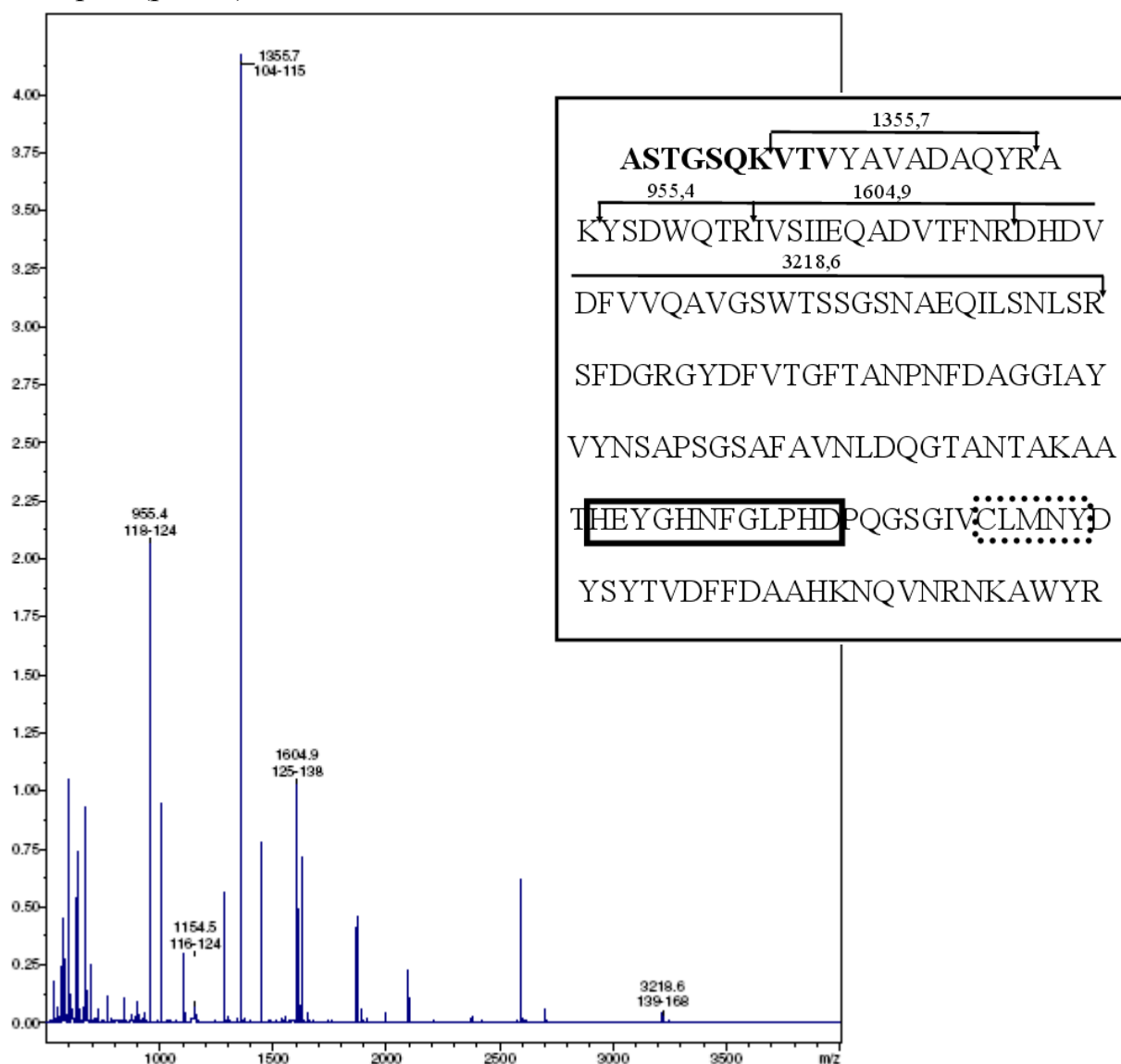


Рис.5. MALDI-TOF масс-спектрометрия пептидов, полученных в результате обработки металлопротеиназы MprBi трипсином. Показана аминокислотная последовательность металлопротеиназы. Стрелками отмечены связи, гидролизуемые трипсином. Над стрелками указаны массы полученных пептидов (Да). Полужирным отмечены первые 10 аминокислот на N-конце зрелого белка (ASTGSQKVT). Рамками выделены продленный мотив активного центра (сплошная линия) и Met-поворот (пунктирная линия)

Итак, впервые установлена первичная последовательность аминокислот зрелой металлопротеиназы, секретируемой рекомбинантным штаммом в культуральную жидкость. По результатам определения фермент включает в себя 174 аминокислотных остатка. Рассчитанная молекулярная масса препарата металлопротеиназы составила 19050 Да, что соответствует молекулярной массе

гомогенного фермента, полученной в результате SDS-электрофореза. MALDI-TOF масс-спектрометрия не позволила корректно установить N-концевую аминокислотную зрелой молекулы металлопротеиназы MprBi. Для её определения был использован метод Эдмана. N-концевая последовательность белка, установленная данным методом, содержит 10 аминокислот ASTGSQKVTV с N-концевым аланином. Установлено, что аминокислотная последовательность металлопротеиназы идентична последовательности аминокислот, полученной на основании последовательности нуклеотидов секвенированного гена *mprBi*.

Совокупность данных анализа структуры белка позволили нам внести уточнения в организационную структуру гена *mprBi* (AN 75740.2): он включает последовательность, кодирующую сигнальный пептид из 30 аминокислотных остатков, пропептидную последовательность из 66 аминокислотных остатков и последовательность зрелого белка, которая включает 174 аминокислотных остатка (рис.5).

Сравнительный анализ первичной структуры металлопротеиназы MprBi с ферментами клана метцинкинов

В аминокислотной последовательности MprBi мы идентифицировали фрагмент с консервативными аминокислотными остатками **HEVGHNFGGLPHD** (выделены полужирным шрифтом). В этом фрагменте содержатся три гистидиновых остатка His126, His130 и His136, остаток глутамата Glu127, расположенный рядом с первым гистидином, и остаток глицина Gly133 между вторым и третьим гистидиновыми остатками. Все они характерны для продленного мотива активного центра семи семейств клана метцинкинов [Gomis-Rüth et al., 2009]. Это позволяет нам отнести металлопротеиназу MprBi к клану метцинкинов класса цинкзависимых металлопротеиназ (рис. 6).

Кроме того, в аминокислотной последовательности эндопептидазы MprBi обнаружен единственный остаток Met147, а также остатки Cys145 и Tyr149. Наличие этих остатков в зрелой молекуле MprBi позволяет предположить, что содержащий их фрагмент CLMNY представляет собой структуру Met-поворота, локализованного на расстоянии 8 аминокислотных остатков от C-конца продленного мотива активного центра. Этот фрагмент с единственным метионином в аминокислотной последовательности белка указывает, что полученная нами цинкзависимая металлоэндопептидаза MprBi относится к клану метцинкинов, для которого структура Met-поворота является консервативной. Анализ структуры мотива активного центра и структуры Met-поворота позволяет определить семейство, к которому принадлежит протеиназа MprBi. Консервативный Asp, расположенный в мотиве активного центра после третьего His, а также Cys в структуре Met-поворота указывают на принадлежность MprBi к семейству адамализинов/репролизинов. Наличие в структуре Met-поворота тирозина в положении, характерном для «тирозинового переключателя» в совокупности с N-концевым расположением сигнальной последовательности сближает исследуемый нами фермент с семейством астацинов. Другой особенностью MprBi, сближающей его с астациноподобными эндопептидазами является N-концевой Ala1 в зрелой молекуле белка. В семействе астацинов имеется единственный представитель бактериальных белков – это флаваастацин грамотрицательной бактерии *Flavobacterium meningosepticum* [Pfleiderer et al., 1967] (рис. 6). Остальные члены

семейства астаиноподобных эндопептидаз являются эукариотическими белками. В семействе адамализинов/репролизинов представлены ферменты высших эукариот (змеи и млекопитающие). Мы относим металлопротеиназу MprBi к адамализинам/репролизином на основании того, что в последовательности мотива активного центра металлопротеиназы MprBi после третьего гистидина (His136) расположена аминокислота Asp, а не Glu, которая необходима при стабилизации молекулы зрелого астаина в процессе активации [Yiallourous et al., 2002, Bode et al., 1992, 1993, Guevara et al., 2010].

Метцинкиновые металлопротеиназы	мотив активного центра												Met-поворот				
АСТАЦИНЫ																	
Астацин (краб)	H	E	L	M	H	A	I	G	F	Y	H	E	S	I	M	H	Y
α-MEP (мышь)	H	E	I	L	H	A	L	G	F	F	H	E	S	L	M	H	Y
β-MEP (крыса)	H	E	F	L	H	A	L	G	F	W	H	E	S	V	M	H	Y
BMP1/проколлаген С- протеиназа (человек)	H	E	L	G	H	V	V	G	F	W	H	E	S	I	M	H	Y
SPAN/BP10 (морской ёж)	H	E	I	G	H	A	I	G	F	H	H	E	S	I	M	H	Y
Толлоид-протеиназа (<i>Dr. melanogaster</i>)	H	E	L	G	H	T	I	G	F	H	H	E	S	I	M	H	Y
Флавастацин (<i>F.meningosepticum</i>)	H	E	I	M	H	S	M	G	I	M	H	E	S	V	M	M	Y
СЕРРАЛИЗИНЫ																	
Протеиназа <i>Serratia</i>	H	E	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P	S	L	M	S	Y
Протеиназа В (<i>E. chrysanthemi</i>)	H	E	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P	S	I	M	S	Y
Протеиназа <i>P.aeruginosa</i> [43]	H	E	I	G	H	T	L	G	L	S	H	P	S	V	M	S	Y
МАТРИКСИНЫ																	
MMP-1 (коллагеназа 1 фибробластов человека)	H	E	L	G	H	S	L	G	L	S	H	S	A	L	M	Y	P
MMP-3 (человеческий стромелизин-1)	H	E	I	G	H	S	L	G	L	F	H	S	A	L	M	Y	P
MMP8 (нетрофильная коллагеназа 2)	H	E	F	G	H	S	L	G	L	A	H	S	A	L	M	Y	P
РЕПРОЛИЗИНЫ																	
Адамализин II (<i>C.adamanteus</i>)	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	C	I	M	R	P
Атролизин С	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	C	I	M	R	P
Тримерелизин	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	C	I	M	S	D
Акутолизин А [39]	H	E	M	A	H	N	L	G	V	S	H	D	C	I	M	S	P
ТЕРМОЛИЗИН																	
Термолизин (<i>B. thermoproteolyticus</i>) [42]	H	E	L	T	H	A	V	T	D	Y	T	A	нет				
	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	145	146	147	148	149
MprBi (<i>B. intermedius</i>)	H	E	Y	G	H	N	F	G	L	P	H	D	C	L	M	N	Y

Рис.6. Мотив активного центра и Met-поворот метцинкиновых металлоэндопептидаз. Выделены консервативные аминокислоты активного центра и метионин в Met-повороте [Jiang et al., 1992b, Gong et al., 1998, Bode et al., 1992, 1993]

Так как остаток Glu103 характерен только для членов астаинового семейства (рис. 6), некоторые исследователи считают, что Glu103 также относится к мотиву

HELMHAIGFYHE активного центра астацина [Bode et al., 1992, Jiang et al., 1992, Gomis-Rüth et al., 1993].

Структура Met-поворота MprVi является более противоречивой: остаток Tyr149, характерный для всех представителей семейства астацинов и играющий важную роль в каталитическом акте, присутствует в структуре MprVi параллельно с Cys145, характерным для всех ферментов семейства ADAMs. Отметим, что Tyr в этой позиции характерен для ферментов семейства серрализинов. Все серрализины синтезируются без сигнального пептида, его роль выполняет С-домен фермента [Gomis-Rüth, 2003]. Для MprVi показано N-концевое расположение сигнальной последовательности (AN 75740.2), что не соответствует семейству серрализинов. В отличие от Tyr149, Cys145 в структуре MprVi указывает на принадлежность MprVi к семейству адамализинов/репролизинов. Таким образом, каталитически значимый остаток Tyr149 является особенностью структуры бациллярной адамализиноподобной эндопептидазы MprVi, сближающей её с ферментами семейства астацинов.

Субстратная специфичность MprVi

Была исследована специфичность металлопротеиназы MprVi по гидролизу синтетических хромогенных субстратов (табл. 6). Металлопротеиназа MprVi гидролизует синтетические тетрапептиды интенсивнее, чем трипептиды. Вероятно, более длинные субстраты быстрее связываются с активным центром фермента [Воюшина с соавт., 1991, Stöcker et al., 1990]. Металлопротеиназа не проявляет строгой субстратной специфичности, так как спектр аминокислотных остатков, образующих гидролизуюмую пептидную связь, достаточно широк.

Таблица 6

Специфичность металлопротеиназы по гидролизу синтетических субстратов

Субстрат	Активность, ед/мг $\times 10^{-4}$
Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg	51,48
Dnp-Gly-Gly-Leu-Arg	36,52
Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH ₂	28,16
Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg	26,4
Dnp-Ala-Ala-Val-Arg	14,52
Dnp-Gly-Gly-Lys	5,72

Исследована специфичность металлопротеиназы по гидролизу В-цепи окисленного инсулина. Данные масс-спектрометрии при изучении продуктов расщепления подтвердили, что фермент не проявляет предпочтения к определенным аминокислотам расщепляемой пептидной связи (рис. 7), что свидетельствует о широкой субстратной специфичности протеиназы MprVi. Известно, что ферменты клана метцинкинов проявляют узкую субстратную специфичность, а многие ферменты семейства MMPs (матриксинов) и адамализинов осуществляют ограниченный протеолиз природных субстратов. Показано, что эндопептидаза PrtA из патогенного насекомого *Photorhabdus luminescens*, относящаяся к семейству серрализинов, гидролизует В-цепь окисленного инсулина только по связям Val, Ala и Leu [Marokhazi et al., 2007]. Активность астацина *Astacus astacus* L – одного из характерных представителей семейства - определяется по гидролизу казеина, азоказеина, желатина, коллагена, В-цепи окисленного инсулина при нейтральном

значении рН. При расщеплении пептидных связей В-цепи окисленного инсулина астацин проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1', к пролину в положении P2 и P3 и к гидрофобным остаткам в положении P3' и P4', что говорит о более строгой субстратной специфичности, чем у MprBi. Меприн β предпочитает отрицательно заряженные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, в то время как меприн α гидролизует связи по остаткам алифатических и ароматических аминокислот. Кроме того, меприн α проявляет предпочтение к пролину, отстоящему на несколько аминокислот от разрезаемой связи [Beynon et al., 1981].

Рис.7. Гидролиз В-цепи инсулина металлопротеиназой MprVi и эндопептидазой PrtA

Сравнивая специфичность MprVi с другими ферментами клана метцинкинов отметим, что структура активного центра, общая для этого клана, по-видимому, определяет минимальную длину гидролизуемого пептида – не менее 4 аминокислотных остатков, но не влияет на спектр аминокислот, участвующих в образовании расщепляемой связи. Интересным является тот факт, что MprVi, в отличие от других хорошо изученных метцинкинов, не обладает выраженной субстратной специфичностью.

Таблица 7

Физико-химические свойства металлоэндопептидазы MprBi	
K_m , mM	0,06
k_{cat} , c ⁻¹	1213
pI	5,4
pH-Оптимум	8,0
pH-Стабильность	7,2 – 9,0
Температурный оптимум, °C	55
Термостабильность, °C	22 - 55

Константа Михаэлиса K_m по гидролизу азоказеина составляет 0,06 мМ. Каталитическая константа k_{cat} равна 1213 с⁻¹. Изоэлектрическая точка металлопротеиназы рІ составляет 5,4.

рН-оптимум и рН-стабильность MprBi

Установлено, что рН-оптимум металлопротеиназы в 0,05 М трис-НСl буфере с 5 мМ Ca²⁺ соответствует 8,0 (рис. 8).

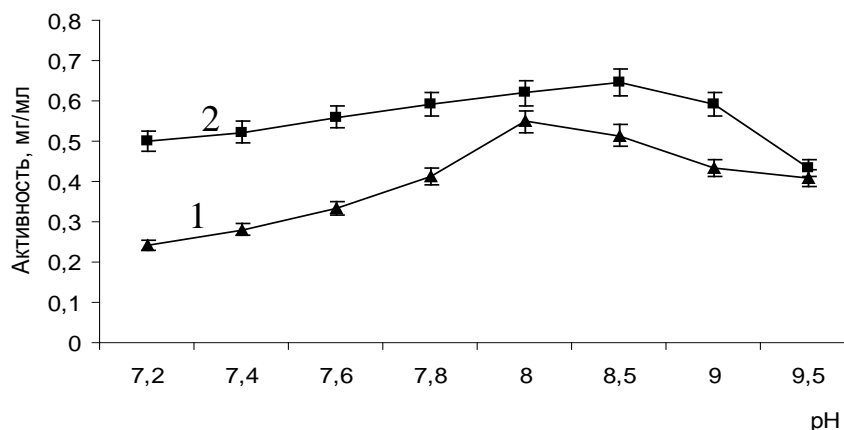


Рис. 8. рН-Оптимум и рН-стабильность металлопротеиназы. 1 – рН-оптимум металлопротеиназы; 2 - рН-стабильность металлопротеиназы

Это указывает на то, что исследуемый фермент относится к группе щелочных металлопротеаз. Белок стабилен в интервале рН от 7,2 до 9,0.

Температурный оптимум и термостабильность

При исследовании влияния температуры на активность металлопротеиназы установлено, что температурный оптимум фермента соответствует 50-55°С. Белок проявляет стабильность в интервале температур от 22 до 55°С (рис. 9).

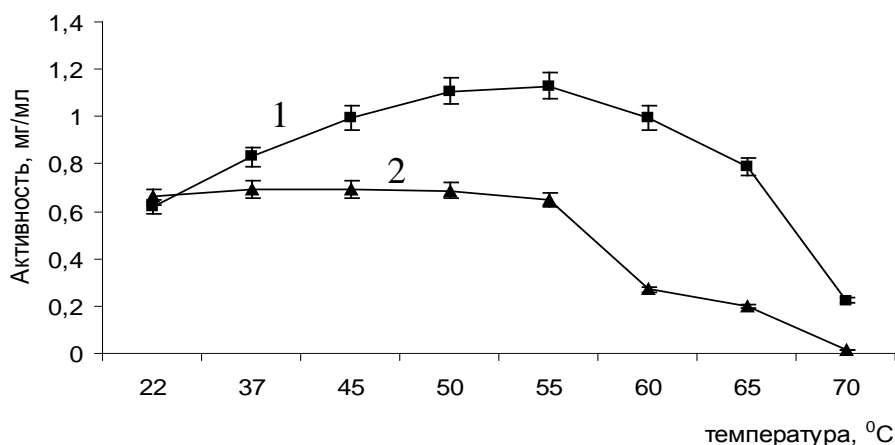


Рис. 9. Влияние температуры на активность металлопротеиназы. 1 – температурный оптимум фермента; 2 - термостабильность металлопротеазы

Влияние ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы MprBi

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность фермента показало, что ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ в концентрации 10 мМ повышают активность белка на 30 и 20% соответственно. Ионы Co²⁺, Cu²⁺ и Ni²⁺ в концентрациях от 1 до 20 мМ

снижают активность металлопротеиназы, причем, с увеличением концентрации это снижение более значительно. Низкие концентрации ионов Zn^{2+} (0,01 мМ) практически не влияют на активность фермента, увеличение же его концентрации приводит к резкому снижению активности (рис. 10)

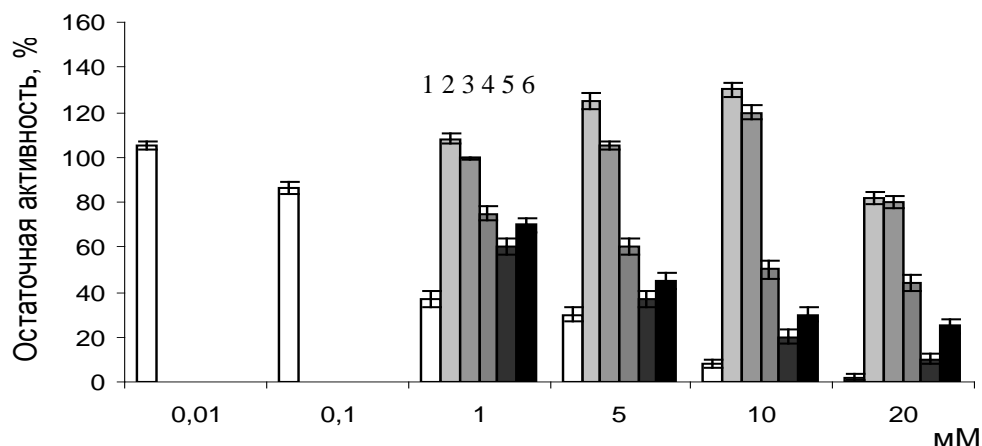


Рис. 10. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы MprBi. За 100% принимали активность белка в отсутствии в реакционной смеси ионов металла. 1 – Zn^{2+} ; 2- Ca^{2+} ; 3 – Mg^{2+} ; 4 – Co^{2+} ; 5 – Cu^{2+} ; 6 – Ni^{2+} ;

Таким образом, в результате проведенной работы был получен гомогенный препарат металлоэндопептидазы MprBi, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* BG 2036 (*pSA1*). На основании определения и анализа первичной структуры MprBi установлено, что исследуемая нами рекомбинантная металлопротеиназа относится к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов класса цинкзависимых протеиназ и является первым представителем данного семейства у прокариот в целом и у бацилл в частности. Однако, структурные особенности этого фермента (Туг в Met-повороте и N-концевой Ala1) сближают его с эндопептидазами астаинового семейства. Возможно, подобное смешение признаков является ключевой особенностью бациллярных адамализиноподобных эндопептидаз.

ВЫВОДЫ

1. Подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий уровень продукции металлоэндопептидазы *B. intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*.
2. Выделена и очищена гомогенная металлоэндопептидаза MprBi со степенью очистки 350 и выходом 11,3%. Молекулярная масса металлоэндопептидазы составляет 19 kDa.
3. Методом MALDI-TOF спектрометрии установлена аминокислотная последовательность MprBi, определена N-концевая последовательность зрелого фермента. Фермент классифицирован как металлоэндопептидаза семейства адамализинов/репролизинов клана метцинкинов цинкзависимых металлопротеиназ.
4. Установлено, что металлопротеиназа MprBi обладает широкой субстратной специфичностью по гидролизу синтетических и природных субстратов.
5. Установлено, что металлоэндопептидаза MprBi является щелочным термостабильным ферментом, активность которого зависит от присутствия ионов двухвалентных металлов. pH-Оптимум действия фермента лежит в области pH 8,0, интервал стабильности MprBi 22-55 °C.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Mikhailova, E.O. Purification of a subtilisin-like serine proteinase from recombinant *Bacillus subtilis* during different phases of growth / E.O. Mikhailova, N.P. Balaban, A.M. Mardanova, **N.L. Rudakova**, O.N. Ilyinskaya, G.N. Rudenskaya, A.A. Rizvanov, M.R. Sharipova // *Annals of Microbiology*, - 2009 – V.59, №2, - P.301-307.
2. Балабан, Н.П. Металлоэндопептидазы клана метцинкинов: классификация, свойства, структурные особенности / Н.П. Балабан, **Н.Л. Рудакова**, А.Р. Сабирова, О.Н. Ильинская, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2010. – Т.152, кн.2. – С. 57-77.
3. **Рудакова, Н.Л.** Секретируемая металлоэндопептидаза *Bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств / Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, А.Р. Каюмов, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2010. – Т.152, кн.2. – С. 145-154.
4. **Рудакова, Н.Л.** Характеристика цинкзависимой эндопептидазы *Bacillus intermedius* / Н.Л. Рудакова, Н.П. Балабан, Ю.В. Данилова, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биохимия. – 2010. – Т.75, №10. – С.1462-1470.
5. Sabirova A.R., **Rudakova N.L.** A novel secreted metalloproteinase *Bacillus intermedius* / A.R. Sabirova, N.L. Rudakova, N.P. Balaban, O.N. Ilyinskaya, I.V. Demiduyk, S.V. Kostrov, G.N. Rudenskaya, M.R. Sharipova // *FEBS letters*. – 2010. – V.584, №21. – P.4419-4425.
6. **Рудакова, Н.Л.** Протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 на поздних стадиях роста / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // Тезисы докладов IV научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-

образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2004. – С.66.

7. Соколова, Е.А. Каталитические и биологические свойства субтилизинов *Bacillus intermedius* 3-19 / Е.А. Соколова, **Н.Л. Рудакова**, Е.Л. Ицкович, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань, 2004. –С.24.
8. **Рудакова, Н.Л.** Влияние компонентов питательной среды на продукцию субтилизина *Bacillus intermedius* 3-19 поздней стационарной фазы роста / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова // Материалы научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань, 2004. –С.73.
9. **Рудакова, Н.Л.** Протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 на поздних стадиях роста / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова // Материалы XLII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, 2004. – С.33. (Диплом III степени)
10. **Рудакова, Н.Л.** Среда для биосинтеза металлопротеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Н.Л. Рудакова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес». – Казань, 2005. – С.66.
11. **Рудакова, Н.Л.** Получение металлопротеиназы *Bacillus intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* / Н.Л. Рудакова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов и стендовых сообщений VI симпозиума «Химия протеолитических ферментов». - Москва, 2007. - С.76.
12. **Рудакова, Н.Л.** Гетерологичная экспрессия гена нейтральной протеазы *Bacillus intermedius* в клетках *Bacillus subtilis* / Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы конференции «Ломоносов-2007». – Москва, 2007. – С.18.
13. **Рудакова, Н.Л.** Выделение и очистка металлопротеиназы *B. intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 / Н.Л. Рудакова, Ю.В. Данилова // Материалы конференции «Ломоносов-2009». – Москва, 2009. – С.11.
14. **Рудакова, Н.Л.** Новая металлопротеиназа *Bacillus intermedius* / Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, Ю.В. Данилова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Казань, 2009. – С.298. (Грамота за лучший доклад).
15. Шарипова, М.Р. Особенности регуляции функциональной активности и экспрессии генов протеиназ в условиях стресса у бацилл / М.Р. Шарипова, А.А. Тойменцева, А.Р. Каюмов, А.Р. Сабирова, **Н.Л. Рудакова**, Н.П. Балабан // Тезисы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Казань, 2009. – С.96.
16. **Рудакова, Н.Л.** Новая секретируемая металлоэндопептидаза *Bacillus intermedius* / Н.Л. Рудакова, Н.П. Балабан // Тезисы докладов Российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». – Казань, 2010. – С.50.

